

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره یازدهم، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱، ۳۴-۲۱

اکوآپورین ۴ و نقش محافظتی استروئیدهای جنسی بر آسیب مغزی ناشی از تروما در موش صحرایی ماده

نادر شاهرخی^۱، محمد خاکساری^۲، غلامعباس محمدی^۳، رضا عباسی^۴، علی سیاه پشت^۵، رضا محمودی^۶

دریافت مقاله: ۸۹/۶/۲۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۹/۱۰/۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۰/۱/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۰/۲/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: آسیب مغزی ناشی از تروما معمولترین علت مرگ در تصادفات می‌باشد. مطالعات متعدد نقش محافظت نورونی برای استروژن و پروژسترون پس از ضربه مغزی را پیشنهاد کرده‌اند. در مطالعه حاضر، نقش مقادیر مختلف استروئیدهای جنسی بر تغییرات غلظت پروتئین اکوآپورین ۴ بافت مغزی در موش‌های صحرایی ماده فاقد تخمدان پس از ضربه مغزی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مداخله‌ای- تجربی، از ۱۴۰ سر موش صحرایی ماده نژاد آلبینو N - ماری که به طور تصادفی به ۷ گروه و هر گروه خود به دو زیر گروه تقسیم شدند، استفاده گردید. گروه‌های مورد مطالعه عبارت بودند از: ۱- شم، ۲- شم اوارکتومی شده، ۳- حلال، ۴ و ۵- مقدار فیزیولوژیک و فارماکولوژیک استروژن (به ترتیب ۳۳/۳ میکروگرم بر کیلوگرم و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ۶ و ۷- مقدار فیزیولوژیک و فارماکولوژیک پروژسترون (به ترتیب ۱/۷ و ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم). در گروه‌های ۳ تا ۷، جراحی تروماتیک مغزی به روش مارمارو القا شد و ۳۰ دقیقه بعد از ضربه، هورمون‌ها به صورت داخل صفاقی تزریق شدند و ۲۴ ساعت بعد از ضربه محتوای آب، میزان غلظت اکوآپورین ۴ و ۵ ساعت بعد از ضربه محتوای آبی ایوانز مغز ارزیابی شد.

یافته‌ها: مقدار فیزیولوژیک و فارماکولوژیک استروژن نسبت به حلال، بیان اکوآپورین ۴ ($p < 0/01$)، محتوای آب مغز ($p < 0/01$) و نفوذپذیری سد خونی- مغزی ($p < 0/001$) را به طور معنی‌داری کاهش داد. مقدار فیزیولوژیک و فارماکولوژیک پروژسترون محتوای آب مغز را در مقایسه با حلال به طور معنی‌داری کاهش داد ($p < 0/001$) ولی بر بیان اکوآپورین ۴ اثرات معنی‌داری نشان نداد. مقدار فیزیولوژیک پروژسترون محتوای آبی ایوانز مغز را کاهش داد، اما مقدار فارماکولوژیک آن موجب افزایش محتوای آبی ایوانز مغز شد ($p < 0/001$).

نتیجه‌گیری: مقادیر فیزیولوژیک و فارماکولوژیک استروژن، بیان اکوآپورین ۴ را در مغز تروماتیک کاهش داد ولی پروژسترون چنین اثری نشان نداد. برای استروژن این اثرات شاید یکی از سازوکارهای مؤثر در بهبود آسیب مغزی باشد.

واژه‌های کلیدی: استروژن، پروژسترون، اکوآپورین ۴، آسیب تروماتیک مغز

۱- استادیار گروه آموزشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۲- (نویسنده مسئول) استاد گروه آموزشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و مرکز آموزش بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۲۰۰۸۱، دورنگار: ۰۳۴۱-۳۲۲۱۶۷۲، پست الکترونیکی: Khaksar38@yahoo.co.uk

۳- دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۴- پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۵- مربی گروه آموزشی فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۶- کارشناس ارشد گروه آموزشی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مقدمه

ضربه مغزی (Trauma Brain Injury) از شایع‌ترین علل مرگ و ناتوانی افراد جوان در جهان است [۱]، اما درمان‌های کلینیکی در توقف سریع TBI محدود و بسیار کم می‌باشند. ادم مغز، توسط گسستگی سد خونی-مغزی (Blood brain barrier) و نفوذ فاکتورهای التهابی در جراحت مغزی ایجاد می‌شود که در صورت عدم کنترل آن منجر به افزایش مرگ و میر می‌گردد. گزارش شده است که ایسکمی مغزی ناشی از خیز مغزی، علت عمده مرگ و ناتوانی ناشی از ضربه مغزی در روزهای اول پس از ضربه است و مشخص گردیده که مرگ و میر بیشتر به علت خیز مغزی است تا ایسکمی ناشی از خونریزی [۲]؛ لذا کاهش خیز مغزی عامل تعیین‌کننده و مؤثر در روند بهبودی سریع در اختلالات ناشی از ضربه و انفارکتوس مغزی می‌باشد و به همین دلیل مطالعات زیادی در ارتباط با کاهش خیز مغزی ناشی از ضربه به سر، صورت گرفته است [۳].

از جمله موادی که در این ارتباط استفاده شده‌اند، هورمون‌های جنسی تخمدانی می‌باشند که به عنوان عوامل حفاظتی در خیز و آسیب‌های مغزی و همچنین عامل رشد و تکثیر بافت عصبی مورد توجه قرار گرفته‌اند. در مطالعات قبلی نقش مثبت این هورمون‌های جنسی در کاهش خیز مغزی و اثر آنها در کاهش فشار داخل جمجمه‌ای و افزایش فشار پرفیوژن مغز بعد از ضربه مغزی منتشر به عنوان یکی از سازوکارهای حفاظتی مورد تأیید قرار گرفت [۴].

اکوآپورین‌ها عمدتاً با نفوذپذیری بالا به آب توصیف می‌شوند. در بین آنها، اکوآپورین ۴ در سرتاسر مغز توزیع شده است اما بیشتر در انتهای زواید آستروگلیان‌ها که بین مغز و مایع مغزی نخاعی قرار دارند، پیدا می‌شود. توزیع سلولی و سازوکارهای تنظیمی بیان آنها متفاوت است [۵]. گزارش شده است که اکوآپورین‌ها می‌توانند به عنوان گیرنده‌های اسمزی عمل کنند. در تأیید نقش اکوآپورین ۴ در نگهداری آب مشخص شد موش‌های مبتلا به کمبود اکوآپورین ۴ نسبت به نوع طبیعی، در برابر خیز مغزی ایجاد شده توسط مسمومیت حاد آب، بقاء بهتری داشتند. همچنین محتوای آب مغز و تورم زوائد آستروسیتی دور مویرگی در موش‌هایی با کمبود اکوآپورین ۴، کمتر شده بود [۶].

ناهنجاری اکوآپورین‌ها در بیماری‌های متعدد مغز همچون حمله‌ها، تروما، عفونت و ناهنجاری‌های متابولیکی، سبب تورم و آسیب‌پذیری مغز می‌شود [۵]. مطالعات متعدد نشان داده است که به دنبال ضربه تروماتیک قشری در رت‌ها، بیان اکوآپورین ۴، مرتبط با ادم مغزی و نفوذپذیری سدخونی - مغزی می‌باشد. گسستگی سد خونی - مغزی کارآمدترین القاءکننده بیان mRNA، اکوآپورین ۴ در آستروسیت‌های هیپرتروفیک می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داد که استروئیدهای جنسی می‌توانند سلامت سدخونی - مغزی را مجدداً سبب گردند [۷].

بررسی‌های متعدد نشان داد که اکوآپورین ۴ نقش مهمی در هومئوستاز یونی از طریق تسهیل انتشار آب بازی می‌کند [۸-۹]. شواهد متعددی درگیری اکوآپورین‌ها را در تشکیل خیز مغزی پیشنهاد کرده‌اند که می‌توان:

می‌شد. این پژوهش با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفته است.

گروه‌های مورد مطالعه: حیوانات به ۷ گروه و هر گروه خود به دو زیر گروه تقسیم شد (یک زیر گروه برای ارزیابی محتوی آب و آکوپورین ۴ مغز، زیر گروه دیگر برای ارزیابی محتوی آبی ایوانز مغز). تعداد حیوان‌ها در هر زیر گروه ۱۰ سر بود. در تمامی گروه‌های تحت درمان، داروهای مورد نظر ۳۰ دقیقه پس از تروما تجویز می‌شد. لازم به ذکر است که میزان مرگ و میر به طور متوسط ۳۰٪-۲۰٪ بود. گروه‌ها عبارت بودند از:

۱- گروه شم: حیوان‌های ماده سالمی که بیهوش شده و زیر دستگاه ایجادکننده ضربه مغزی قرار می‌گرفتند، اما ضربه دریافت نمی‌کردند. ۲- گروه شم اوارکتومی: موش‌های صحرایی ماده‌ای که تخمدان‌های آن‌ها برداشته شده و پس از بیهوشی زیر دستگاه ایجادکننده ضربه مغزی قرار می‌گرفتند، اما ضربه دریافت نمی‌کردند. ۳- گروه حلال: حیوان‌هایی که دو هفته بعد از اوارکتومی تحت ضربه مغزی قرار گرفتند و ۳۰ دقیقه پس از ضربه مغزی هم حجم داروی مصرفی حلال استروژن و پروژسترون (روغن کنجد و بنزیل الکل) به صورت داخل صفاقی به آنها تزریق شد [۱۲-۱۳]. ۴ و ۵- گروه مقدار فیزیولوژیک و فارماکولوژیک استروژن (به ترتیب ۳۳/۳ میکروگرم بر کیلوگرم و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم): حیوان‌هایی که دو هفته بعد از اوارکتومی تحت ضربه مغزی قرار می‌گرفتند، ۳۰ دقیقه پس از ضربه مغزی استروژن به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۱۳]. ۶ و ۷- گروه مقدار فیزیولوژیک و فارماکولوژیک پروژسترون (به ترتیب ۱/۷ و ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم): حیوان‌هایی که دو هفته بعد از اوارکتومی تحت

- تغییرات بیان آکوپورین ۴ در نواحی دچار خیز پس از جراحی مغزی و یا توسط تومور - تغییرات تشکیل خیز در موش‌های فاقد آکوپورین ۴ و آلفاسینتروفین ۳ - تغییرات بیان آکوپورین در شرایط پاتولوژیکی را نام برد [۶].

تنظیم افزایشی آکوپورین ۴ ممکن است در ارتباط با خیز باشد، اما این که آیا افزایش آن سبب خیز می‌شود یا یک سازوکار جبرانی در تداوم ادم می‌باشد، نامشخص است [۶، ۱۰]. برخی مطالعات نشان داده‌اند که آکوپورین ۴ مغز نه تنها در تشکیل ادم مغزی، چنانچه سابقاً نشان داده شده بود، شرکت می‌کند بلکه در جذب آب اضافی مغز نیز شرکت دارد [۶]. مطالعه حاضر با توجه به دلایلی از جمله: درک ضعیف سازوکارهای مولکولی جهت تنظیم نفوذپذیری آب در مغز، اثرات متفاوت هورمون‌ها بر فعالیت آکوپورین ۴ در مغز و سایر بافت‌ها [۱۱]، گزارشات ضد و نقیض در بیان آکوپورین ۴ [۱۰]، استفاده درمانی از تنظیم‌کننده‌های آکوپورین در ادم مغزی و سایر بیماری‌ها و نقش واسطه‌گری احتمالی آکوپورین‌ها در سازوکارهای حفاظتی استروئیدهای جنسی در خیز مغزی ناشی از تروما، انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مداخله‌ای - تجربی از ۱۴۰ سر موش صحرایی نژاد آلبینو N - ماری جنس ماده با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوان‌ها در شرایط دمایی ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی کرمان نگهداری می‌شدند و آب و غذا آزادانه در اختیار آنها قرار داده

گرمی از ارتفاع ۲ متری در داخل یک لوله با سقوط آزاد بر روی سر حیوان بی‌هوش فرود می‌آید، یک صفحه فلزی از جنس استیل به منظور پخش یکنواخت ضربه بر روی مجسمه قرار می‌گرفت. بعد از القای ضربه مغزی حیوان سریعاً به پمپ تنفسی حیوانات (animal respiratory, TSA compact، آلمان) وصل می‌شد. پس از برقراری تنفس خودبخودی، حیوان از دستگاه ونتیلاسیون جدا و به قفس باز گردانده می‌شد و تحت مراقبت قرار می‌گرفت [۱۳].

تعیین محتوای آب مغز: برای اندازه‌گیری خیز مغزی از روش اندازه‌گیری محتوای آب مغز استفاده شد. بدین طریق که در پایان ۲۴ ساعت پس از القای ضربه مغزی و بعد از بیهوشی، بافت مغز حیوان خارج شد. ابتدا وزن بافت تر اندازه‌گیری شده و سپس به مدت ۷۲ ساعت در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو (Mermert، آلمان) گذاشته می‌شد تا آب آن تبخیر و بافت خشک به دست آید. بافت مجدداً وزن می‌شد و در نهایت با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شد [۱۷، ۱۴]:

$$\text{میزان محتوای آب} = \frac{\text{وزن مرطوب}}{\text{وزن خشک - وزن مرطوب}} \times 100 = \text{بافت مغز به صورت درصد } (\%)$$

تعیین نفوذپذیری سد خونی - مغزی: میزان نفوذپذیری سد خونی - مغزی با اندازه‌گیری مقدار رنگ آبی ایوانز خارج عروقی با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. رنگ آبی ایوانز به صورت پودر است و به پروتئین‌های پلاسما، از قبیل آلبومین متصل شده و به طور طبیعی در داخل عروق محبوس می‌باشد. بنابراین، مشاهده آن در بافت به طور غیر مستقیم نشانگر افزایش

ضربه مغزی قرار می‌گرفتند و ۳۰ دقیقه پس از ضربه مغزی پروژسترون به صورت داخل صفاقی به آنها تزریق شد [۱۳].

داروهای مصرفی: استروژن و پروژسترون و حلال آن‌ها از شرکت دارویی ابوریحان (ایران) خریداری گردید. روش برداشتن دو طرفه تخمدان (اوارکتومی): ابتدا حیوان تحت بیهوشی با ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیوپنتال به روش داخل صفاقی قرار گرفت. سپس قسمت تحتانی شکم تراشیده شده و برش افقی به طول ۳-۴ سانتی‌متر ایجاد شد. بعد از آن پوست، فاشیا و عضلات شکم باز شده و چربی‌ها و روده کنار زده شدند تا رحم و لوله‌های آن آشکار شوند. سپس لوله رحم و پایه عروقی تخمدان با نخ کاتکوت ۴، در ناحیه پروکسیمال گره زده شد و از ناحیه دیستال قطع گردید. این فرآیند در هر دو تخمدان انجام شد. در پایان ۱-۲ میلی‌لیتر محلول سالین داخل شکم ریخته شد و عضلات و پوست به ترتیب با نخ کاتکوت و سیلک ۰-۲ به روش پیوسته بخیه گردید و محل زخم توسط محلول بتادین ضدعفونی شد و حیوان‌ها تا دو ساعت تحت مراقبت ویژه قرار گرفتند. هیچ یک از آنها حین عمل جراحی یا بعد از آن نمردند. به منظور جلوگیری از تداخل هورمونی ناشی از دوره استروس، انجام اوارکتومی حداقل دو هفته قبل از هر عملیات دیگری انجام می‌شد [۱۴-۱۵].

روش ایجاد ضربه مغزی: لوله‌گذاری تراشه برای تمامی حیوانات قبل از TBI انجام شد. روش ایجاد ضربه مغزی متوسط از نوع منتشر و به روش مارمارو (Marmarou) بود [۱۶]. نحوه عملکرد دستگاه القای ضربه مغزی (ساخت گروه فیزیولوژی کرمان) بدین صورت بود که وزنه ۲۵۰

۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته و میزان جذب رنگ آبی ایوانز در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (PG instruments Ltd) اندازه‌گیری می‌گردید. طبق فرمول زیر مقدار رنگ بر حسب میکروگرم در ۱ میلی‌گرم بافت محاسبه می‌شد. هر چه مقدار رنگ در بافت مغزی بیشتر باشد، نشانگر نفوذپذیری بیشتر عروق مغزی و تخریب بیشتر سد خونی-مغزی است [۱۴].

میزان جذب $\times 20 \times 13/24 =$ میکروگرم رنگ آبی ایوانس

وزن بافت در میکروگرم بافت مغزی.

آنالیز وسترن بلات: برای استخراج پروتئین اکوپورین ۴، ۵۰ میلی‌گرم بافت مغز با ۳۰۰ میکرولیتر محلول حاوی بافرلیز (شرکت Roche) و ۲۵ میکرولیتر مهارکننده پروتئاز (Santa Cruz) مخلوط گردیده و توسط دستگاه سونیکاتور (UP 200 Hdr. Hielscher آلمان) هموژنیزه شد. سپس میکروتیوب در سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز بالایی (supernatant) که محتوی پروتئین است در یک میکروتیوب ریخته شد و در دمای ۲۰- درجه نگهداری گردید.

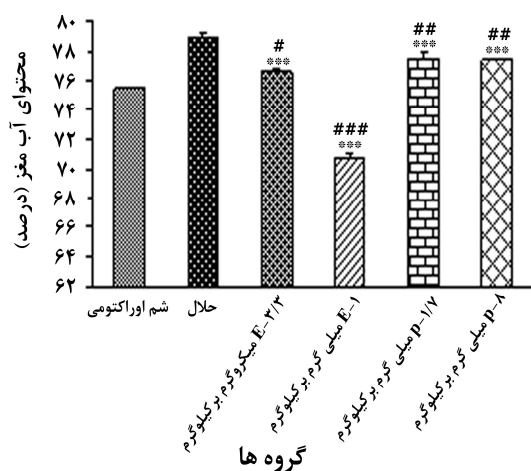
بعد از سنجش میزان پروتئین توسط دستگاه نانو دراپ به مقدار ۲۰ میکروگرم از پروتئین روی Sodium dodecyl (sulfate) - پلی‌آکریل آمید ۱۲/۵٪ قرار داده شد. بعد از انتقال، کاغذ پلی‌وینیلیدین فلوراید (Polyvinylidene) با Ponceau S ۱٪ رنگ‌آمیزی و باندهای پروتئین مشاهده شد. بعد از ۳ بار شستشو با بافر (Tris-buffered (TBST) saline tween-20) (هر بار ۲۰ دقیقه)، مرحله blocking با استفاده از محلول موجود در کیت [۲ گرم شیر خشک

نفوذپذیری عروق و مقدار نشت پروتئین است. مشاهده آن در خارج عروق مغزی یعنی در بافت مغزی نشان‌دهنده تخریب سد خونی-مغزی است. میزان نفوذپذیری عروق مغزی ۵ ساعت پس از تروما با استفاده از میزان محلول آبی ایوانز که از طریق ورید دمی حیوان تزریق می‌شد، اندازه‌گیری گردید [۱۸، ۱۴]. بدین ترتیب که در ساعت چهارم بعد از تروما، حیوان با اثر بی‌هوش‌شده و سپس ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از محلول آبی ایوانز ۲٪ (۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) از طریق ورید و با استفاده از سرسوزن شماره ۲۹ تزریق شد. این تزریق بعد از ثابت کردن حیوان روی میز جراحی و برداشتن پوست و فاسیای پای راست حیوان و رؤیت ورید فمورال صورت گرفت. بعد از یک ساعت از (ساعت پنجم بعد از تروما)، توراکس حیوان تحت بیهوشی با اثر باز شد و بعد از کنار زدن پوست و رؤیت قلب و کلیپ کردن آئورت نزولی، یک سوزن داخل بطن چپ وارد کرده و با محلول سالین ایزوتونیک (۳۰۰-۲۰۰ میلی‌لیتر) به مدت ۲۰ دقیقه شستشو داده شد تا رنگ موجود در عروق مغزی بدین وسیله شسته شود و برای این منظور ورید ژوگولار دو طرف برش داده می‌شد.

تا زمانی که مایع روشن از طریق ورید ژوگولار خارج می‌شد، شستشو ادامه می‌یافت و بلافاصله مغز به سرعت خارج گردیده و وزن می‌شد. مغز پس از قطعه، قطعه کردن در ۲۰ میلی‌لیتر محلول {استن (۱۴ میلی‌لیتر) + سولفات سدیم ۱٪ (۶ میلی‌لیتر)} ریخته شده و برای مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه shaker (تکان‌دهنده) قرار می‌گرفت. پس از آن ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۱ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید مخلوط گردیده و به مدت ۲-۳ دقیقه در جای خنک قرار داده می‌شد و سپس با دور

(۰/۱۵±۰/۳۸/۷۵)، حلال (۰/۲۷±۰/۷۸/۸۴) و مقدار فیزیولوژیک استروژن (۰/۱۹±۰/۵۸/۷۶) کاهش نشان داده است (p<۰/۰۰۱). همچنین گروه حلال در مقایسه با گروه شم اوارکتومی شده، افزایش معنی دار نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۱) و مقدار فیزیولوژیک استروژن در مقایسه با حلال، محتوای آب مغز را به طور معنی داری کاهش داده است (p<۰/۰۵).

محتوای آب مغز در مقادیر فیزیولوژیک پروژسترون (۰/۳۷±۰/۴۲/۷۷) و فارماکولوژیک پروژسترون (۰/۱۹±۰/۳۱/۷۷) در مقایسه با حلال کاهش معنی دار (p<۰/۰۱) و در مقایسه با گروه شم اوارکتومی شده افزایش معنی دار نشان می‌دهند (p<۰/۰۰۱).



نمودار ۱- نمایش اثر مقادیر مختلف استروژن و پروژسترون بر محتوای آب مغزی در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده. ***: (p<۰/۰۰۱) اختلاف معنی دار مقادیر مختلف استروژن و پروژسترون با گروه شم اوارکتومی شده ####: (p<۰/۰۰۱) اختلاف معنی دار مقدار فارماکولوژیک استروژن با گروه حلال. ###: (p<۰/۰۱) اختلاف معنی دار مقادیر مختلف پروژسترون با گروه حلال #: (p<۰/۰۵) اختلاف معنی دار مقدار فیزیولوژیک استروژن با گروه حلال.

در نمودار ۲ محتوای رنگ آبی ایوانز بافت مغز در گروه‌های شم اوارکتومی شده، حلال و مقادیر مختلف

بدون چربی (Skim milk) در ۱۰۰ میلی‌لیتر [TBST] به مدت ۲ ساعت انجام شد. بعد از ۲ ساعت، مجدداً ۳ بار با TBST شستشو (هر بار به مدت ۲۰ دقیقه) شد. در مرحله بعد، آنتی‌بادی اولیه آکوپورین به مدت ۱/۵ ساعت با غلظت ۲۰۰:۱ اضافه شد. بعد از آن ۳ بار شستشو انجام شد و سپس آنتی‌بادی ثانویه (Roche آلمان) به مدت ۱/۵ ساعت با غلظت ۱۰۰:۱ اضافه گردید. مجدداً ۳ مرحله شستشو (هر مرحله ۲۰ دقیقه) انجام شد.

باندهای ایمینوآدیواکتیویته با استفاده از سیستم آشکارساز (Enhanced chemiluminescence) (ECL) دیده شد. فیلم با استفاده از اسکنر Hp مدل Scanject ساخت کشور چین اسکن شد و دانسیته باندها توسط نرم‌افزار Image اندازه‌گیری گردید [۱۹].

روش آماری

جهت مقایسه متغیرهای کمی بین گروه‌های مورد آزمون در صورت رعایت مفروضات از آزمون ANOVA و در غیر این صورت از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد و در صورت معنی دار شدن آزمون اولیه، برای پی بردن به اختلاف بین گروه‌ها از آزمون Tukey استفاده گردید. کلیه داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین بیان شده است (p<۰/۰۵).

نتایج

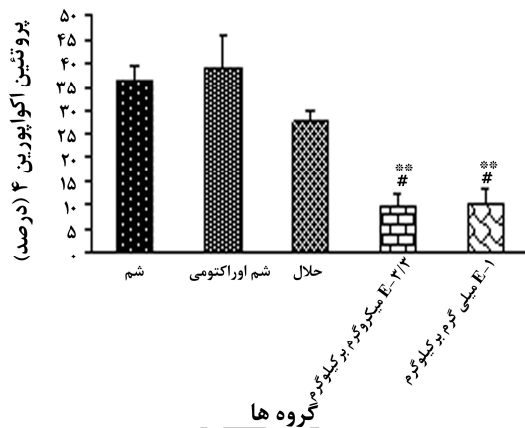
در نمودار ۱، میزان محتوای آب بافت مغزی در گروه‌های شم اوارکتومی شده، حلال و مقادیر مختلف استروژن و پروژسترون نشان داده شده است. محتوای آب مغز در گروه مقدار فارماکولوژیک استروژن (۰/۱۹±۰/۷۸/۷۶) در مقایسه با شم اوارکتومی شده

در نمودار ۳، میزان بیان پروتئین آکوپورین ۴ در گروه‌های شم، شم اوارکتومی شده، حلال و مقادیر مختلف استروژن نشان داده شده است. میزان بیان پروتئین آکوپورین ۴ در گروه مقدار فارماکولوژیک استروژن (۱۰/۲±۲/۴) و یا مقدار فیزیولوژیک استروژن (۹/۸۷±۱/۶۷) در مقایسه با گروه حلال (۲۷/۵۵±۴/۹)، ($p < 0.05$)، همچنین در مقایسه با گروه‌های شم اوارکتومی شده (۳۸/۸±۲/۳) و شم (۳۶/۳±۵/۸) کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد ($p < 0.01$).

فارماکولوژیک استروژن فیزیولوژیک استروژن حلال شم اوارکتومی شم



آکوپورین ۴

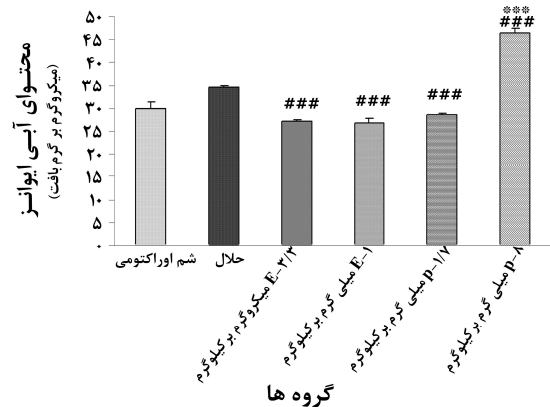


نمودار ۳- آنالیز وسترن بلات، مقایسه میزان بیان پروتئین آکوپورین ۴ بافت مغز در گروه‌های تحت درمان با مقادیر فیزیولوژیک و فارماکولوژیک استروژن در موش‌های صحرایی ماده: # (اختلاف معنی‌دار گروه حلال با مقادیر مختلف استروژن). **: (اختلاف معنی‌دار گروه‌های شم و شم اوارکتومی شده با مقادیر مختلف استروژن).

در نمودار ۴، میزان بیان غلظت پروتئین آکوپورین ۴ در گروه‌های شم، شم اوارکتومی شده، حلال و مقادیر مختلف پروژسترون نشان داده شده است. بیان غلظت

استروژن و پروژسترون نشان داده شده است. میزان رنگ آبی ایوانز در گروه مقدار فیزیولوژیک استروژن (۲۷/۰۳±۰/۳۲) میکروگرم بر گرم بافت مغز) یا گروه مقدار فارماکولوژیک استروژن (۲۶/۷۸±۱) میکروگرم بر گرم بافت مغز) در مقایسه با گروه حلال (۳۴/۴۲±۰/۴۷) میکروگرم/گرم بافت مغز) کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد ($p < 0.01$).

میزان رنگ آبی ایوانز در گروه مقدار فیزیولوژیک پروژسترون (۲۸/۶۵±۰/۱۸) میکروگرم بر گرم بافت مغزی) در مقایسه با حلال کاهش، اما مقدار فارماکولوژیک پروژسترون (۴۶/۵±۱) میکروگرم بر گرم بافت مغز) در مقایسه با حلال افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد ($p < 0.01$). همچنین مقدار فارماکولوژیک پروژسترون در مقایسه با گروه شم اوارکتومی شده (۲۹/۸۵ ± ۱/۰۴) میکروگرم بر گرم بافت مغز) افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد ($p < 0.01$).



نمودار ۲- نمایش اثر مقادیر مختلف استروژن و پروژسترون بر محتوای آبی ایوانز (میکروگرم بر گرم) بافت مغزی در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده. ####: (اختلاف معنی‌دار مقادیر مختلف استروژن و پروژسترون با گروه حلال). ***: (اختلاف معنی‌دار مقدار فارماکولوژیک پروژسترون با گروه شم اوارکتومی شده).

پروژسترون احتمالاً از طریق کاهش بیان ۴ اعمال نشده است.

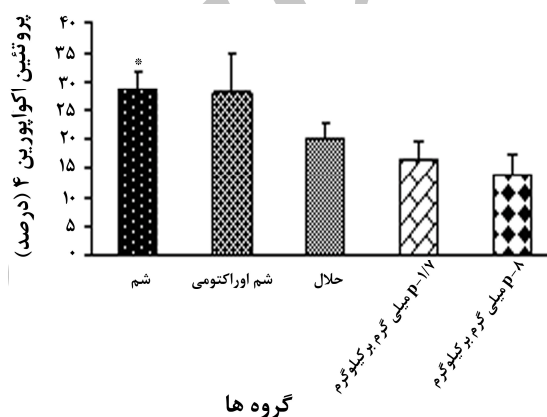
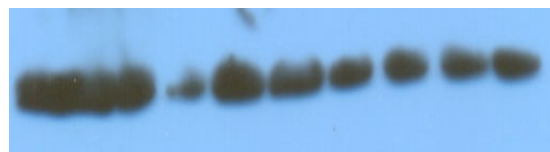
نتیجه تحقیق حاضر در مورد میزان محتوای آب مغز با مطالعات O'Connor و همکاران [۱۳] و سایر پژوهشگران [۲۰-۲۱] که نشان دادند استروژن و پروژسترون سبب کاهش معنی‌دار محتوای آب مغز، پس از TBI می‌شود و این که پروژسترون از طریق کاهش سیتوکین‌های التهابی خیز مغزی را کاهش داده است [۲۲]، مطابقت دارد. مصرف استروژن، نفوذپذیری سدخونی-مغزی در موش‌های صحرایی با التهاب عروقی را کاهش می‌دهد [۲۳].

احتمالاً استروژن از طریق مهار فعالیت Matrix (Metalloproteinase 2) و MMP9 آن‌دوتلیوم عروق مغزی، نفوذپذیری سدخونی-مغزی پس از TBI را کاهش داده است [۱۲] که با نتایج مطالعه حاضر کاملاً همخوانی دارد. تحقیقات Sundry و همکاران که مشخص کردند مصرف پروژسترون در رت‌های اوارکتومی شده منجر به القای فاکتورهای پیش التهابی شده و از این طریق سبب افزایش نفوذپذیری سدخونی-مغزی می‌گردد [۲۳] با نتایج حاصل از مقدار فارماکولوژیک پروژسترون مطابقت دارد.

ناهنجاری اکوآپورین‌ها در بیماری‌های متعدد مغز همچون حمله‌ها، تروما و عفونت سبب تورم مغز و آسیب‌پذیری سریع آن می‌شود [۲۵]. شواهد متعددی درگیری اکوآپورین‌ها را در خیز مغزی پیشنهاد کرده‌اند از جمله: تغییرات بیان اکوآپورین ۴ در نواحی دچار خیز پس از جراحی مغزی و یا توسط تومور، تغییرات تشکیل خیز در موش‌های فاقد اکوآپورین ۴، القای زود هنگام

پروتئین اکوآپورین ۴ در گروه‌های مقدار فارماکولوژیک پروژسترون ($13/79 \pm 3/3$)، مقدار فیزیولوژیک پروژسترون ($16/62 \pm 2/71$) و گروه حلال ($20/03 \pm 2/4$) در مقایسه با گروه شم ($28/05 \pm 3/37$) کاهش معنی‌دار نشان می‌دهند ($p < 0/05$).

فارماکولوژیک استروژن فیزیولوژیک استروژن حلال شم اوارکتومی شم



نمودار ۴- آنالیز وسترن بلات، مقایسه میزان بیان پروتئین اکوآپورین ۴ بافت مغز در گروه‌های تحت درمان با مقادیر فیزیولوژیک و فارماکولوژیک پروژسترون در موش‌های صحرایی ماده. *: ($p < 0/05$) اختلاف معنی‌دار گروه شم با مقادیر مختلف پروژسترون و حلال.

بحث

در مطالعه حاضر نشان داده شد که غلظت‌های مختلف استروژن سبب کاهش معنی‌دار بیان اکوآپورین ۴ پس از TBI شده است، اما غلظت‌های مختلف پروژسترون بر بیان پروتئین اکوآپورین ۴ اثر معنی‌دار نداشت. بنابراین، مقادیر مختلف استروژن، کاهش میزان محتوای آب مغز و نفوذپذیری سدخونی-مغزی را احتمالاً از طریق کاهش بیان اکوآپورین ۴ موجب شده‌اند. اما اثرات ناشی از

دوگانه‌ای در توسعه ادم داشته باشد زیرا درمان با سولفورافان که بیان آکوپورین ۴ را افزایش می‌دهد سبب کاهش ادم به دنبال جراحی تروماتیک مغزی می‌شود. لذا پیشنهاد شده است که القای بیان آکوپورین ۴ می‌تواند کلیرانس آب را در کاهش دادن ادم تسهیل کند [۲۷].

موش‌های فاقد آکوپورین ۴، فشار داخل جمجمه‌ای و محتوای آب مغزی بالاتری پس از انفوزیون مداوم مایع داخل پارانشیمی دارند [۳۳]. گزارش شده است تستوسترون سبب تنظیم افزایش آکوپورین ۴ می‌شود، اما ۱۷-بتا استرادیول بر آن اثری ندارد [۳۴]. به دلیل این که آکوپورین ۴ اجازه انتقال دو طرفه آب را می‌دهد، تصور می‌شود آکوپورین ۴ ممکن است حذف آب اضافی مغز در خیز خارج سلولی را تسهیل کند [۳۵]. پروژسترون تعادل آب را، ۷۲ ساعت پس از TBI بوسیله کاهش بیان آکوپورین ۴ اطراف ناحیه کوفتگی و در لبه‌های بطن جانبی تسهیل می‌کند. مصرف پروژسترون، بیان آکوپورین ۴ در هیپوتالاموس اطراف بطن سوم را افزایش داده و از این طریق تشکیل خیز مغزی را کاهش می‌دهد [۷]. دلایل احتمالی تفاوت نتایج مطالعات فوق با نتایج مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از پیچیدگی در بیان آکوپورین ۴ در نواحی مختلف مغز پس از انواع مدل‌های آسیب مغزی ایجاد شده و همچنین ناشی از تفاوت روش کار و شرایط آزمایش باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً آکوپورین ۴ در اثر محافظتی استروژن بر ضد ادم مغزی ناشی از جراحی تروماتیک مغزی در موش‌های صحرائی

آکوپورین ۴ در انتهای زوائد آستروسیت‌ها [۲۶]. تنظیم افزایشی آکوپورین ۴ در نواحی دچار خیز، مغز دچار کوفتگی، مننژیت باکتریایی و تومورهای مغزی در انسان [۲۶، ۱۰، ۶]. حذف آکوپورین ۴ در موش‌ها باعث کاهش محتوای آبی مغز و تورم زواید پیش عروقی آستروسیتی می‌شود. لذا فقدان آکوپورین ۴ سبب کاهش خیز مغزی در پاسخ به ضربه شده و بهبود حالت نورولوژیک را به دنبال دارد [۲۷]. مهارکننده‌های آکوپورین ۴ با کاهش ورود مایع ادم به داخل پارانشیم مغزی، از تورم سیتوتوکسیک مغزی جلوگیری می‌کنند [۶]. همچنین گزارش شده که آستروسیت‌ها، گیرنده‌های استروژن را در *invivo* و *invitro* بیان می‌کنند و ممکن است شماری از اثرات القایی استرادیول در مغز را میانجی کنند [۲۸]. این گزارشات با نتایج مطالعه حاضر که نشان داد مقادیر مختلف استروژن همراه با کاهش خیز، بیان آکوپورین ۴ را نیز کاهش داده مطابقت دارد.

از طرفی دیگر، در مدل‌های مختلف جراحی مغزی، تغییرات میزان بیان آکوپورین ۴ پیچیده است [۲۶، ۲۹، ۲۳]. نتایج برخی مطالعات با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارند از جمله: میزان بالای پروتئین آکوپورین ۴ در لایه گلیال هیپوتالاموس توانایی آستروسیت‌ها در حفظ استحکام سد خونی-مغزی را موجب می‌شود [۳۰، ۳۱]. افزایش بیان mRNA، آکوپورین ۴ و آکوپورین ۹ در قشر اطراف ناحیه آسیب‌دیده در موش‌های تحت ایسکمی موضعی و افزایش آکوپورین ۴ در مغز انسان با سکنه مغزی [۳۱-۳۲].

از طرف دیگر آکوپورین ۴ در کلیرانس آب در خیز خارج سلولی مهم می‌باشد. شاید آکوپورین ۴ نقش

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی می‌باشد که در مراکز تحقیقاتی علوم اعصاب و فیزیولوژی کرمان تصویب شده است. بدین وسیله از زحمات مدیران محترم مراکز فوق و سایر همکاران تشکر به عمل می‌آید. همچنین از همکاران محترم سرکار خانم حبیب‌پور، آقایان بخشی، گوهرگزی و مهدی‌زاده تقدیر و تشکر می‌شود.

ماده، نقش دارد در حالی که اثرات ضد ادم پروژسترون با واسطه اکوآپورین ۴ اعمال نمی‌شود که تحقیقات بیشتری برای تأیید این پیشنهاد لازم است.

تشکر و قدردانی

References

- [1] Sosin DM, Sniezek JE, Thurman DJ. Incidence of mild and moderate brain injury in the United States, 1991. *Brain Inj* 1996; 10(1): 47-54.
- [2] Ayatacan Ropper AH. Ischemic brain oadema, *J Clin Neuroscience* 2002; 9(2): 113-24.
- [3] Robert I, Schierhout G, Alderson P. Absence of evidence for effectiveness of five interventions routinely used in the intensive care management of severe head injury:a systematic review *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65(5): 729-33.
- [4] Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Liu Y. Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain, *Front Neuroendocrinol* 2001; 22: 33-66.
- [5] Badaut J, Brunet Jf, Regli L. Aquaporins in the brain: from aqueduct to "multi-duct", *Metab Brain Dis* 2007; 22(3-4): 251-63.
- [6] Papadopoulos Mc, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 2007;22(6): 778- 84.
- [7] Djebaili M, Behr JBO. The neurosteroids progesterone, allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2005;22(1):106- 18.
- [8] Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, et al . Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(23): 13615- 20.

- [9] Hiroaki K, Tani A, Kamegawa N, Gyobu K, Nishikawa H, Suzuki ????, et al. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J Mol Biol* 2006;355: 628- 39.
- [10] Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72(2): 262-5.
- [11] Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein, *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(24): 14108-13.
- [12] Liu R, Wen Y, Prez E, Wang X, Day AL, Simpkins JW, et al. 17 β -Estradiol attenuates blood-brain barrier disruption induced by cerebral ischemia reperfusion injury in female rats. *Brain Res* 2005; 1060 : 55-61.
- [13] O'Connor A, Cernak I, Vink R. Both estrogen and progesterone attenuates edema formation following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 2005; 1062(1-2): 171- 4.
- [14] Shahrokhi N, khaksari M, Soltani Z, Mahmoodi M, Nakhee N. Effect of sex steroid hormones on brain edema, intracranial pressure and neurologic outcomes after traumatic brain injury. *can j physiol ,pharmacol* 2010; 88(4): 414-21.
- [15] Wen Y, Yang S, Liu R, Perez E, Yi KD. Koulén, et al. Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia. *Brain Res* 2004; 1008: 147- 54.
- [16] Ito J, Marmarou A, Barzo P, Fatouros P, Corwin F. Characterization of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg* 1996;84(7): 97-103.
- [17] Koyama Y, Matsui S, Itoh S, Osakada M, Baba A, Matsuda T. The selective Na⁺-Ca²⁺ exchange inhibitor attenuates brain edema after radiofrequency lesion in rats. *Eur J Pharmacol* 2004 ;489(3) : 193- 6.
- [18] Lotocki G, Perez ER, Sanchez-Molano J, Furones-Alonso O, Bramlett HM, Dietrich WD. Alterations in blood-brain barrier permeability to large and small molecules and leukocyte accumulation after traumatic brain injury: effects of post-traumatic hypothermia. *J Neurotrauma* 2009; 26(7): 1123- 34.
- [19] Esmaili.-Mahani S, Sheibani V, Kaeidi A, Atapour M, Abbasnejad M. Changes in the gene expression of specific G-protein subunits correlate with morphine insensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuropeptides* 2010; 44(4): 299-304.
- [20] Galani R, Hoffman SW, Stein DG. Effects of the duration of progesterone treatment on the resolution

- of cerebral edema induced by cortical contusions in rats. *Restor Neurol Neurosci* 2001; 18(4): 161- 6.
- [21] Wright DW, Bauer ME, Hoffman SW, Stein DG. Serum progesterone levels correlate with decreased cerebral edema after traumatic brain injury in male rats. *J Neurotrauma* 2001; 18(9): 901-9.
- [22] VanLandingham JW, Virmani S, Hoffman SW, Covey DF, Krishnan K, Hammes SR, et al. The enantiomer of progesterone acts as a molecular neuroprotectant after traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 2006; 51(6): 1078- 85.
- [23] Sunday L, Tran MM, Krause DN, Duckles SP. Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291(2): E261-7.
- [24] Beaumont A, Marmarou A, Fatouros P, Corwin F. Secondary insults worsen blood brain barrier dysfunction assessed by MRI in cerebral contusion. *Acta Neurochir Suppl* 2002 ;81: 217-9.
- [25] Badaut J, Brunet JF, Regli L. Aquaporins in the brain: from aqueduct to "multi-duct". *Metab Brain Dis* 2007 ;22(3-4): 251- 63.
- [26] Ribeiro Mde C, Hirt L, Bogousslavsky J, Regli L, Badaut J. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res* 2006 ;83(7): 1231- 40.
- [27] Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 2000 ;6(2): 159- 63.
- [28] Meffre D, Pianos A, Liere P, Eychenne B, Cambourg A, Schumacher M, et al. Steroid profiling in brain and plasma of male and pseudopregnant female rats after traumatic brain injury: analysis by gas chromatography/mass spectrometry. *Endocrinology* 2007; 148(5): 2505- 17.
- [29] Murphy SJ, Littleton-Kearney MT, Hurn PD. Progesterone administration during reperfusion, but not preischemia alone, reduces injury in ovariectomized rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22(10): 1181- 8.
- [30] Warth A, Kroger S, Wolburg H, Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol* 2004;107(4): 311- 8.
- [31] Aoki K, Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, Wakayama Y. Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction. *Acta Neuropathol* 2003 ;106(2): 121-4.
- [32] Fujita Y, Yamamoto N, Sobue K, Inagaki M, Ito H, Arima H, et al. Effect of mild hypothermia on the

- expression of aquaporin family in cultured rat astrocytes under hypoxic condition, *Neurosci Res* 2003 ;47(4): 437- 44.
- [33] Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman A.S. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *Faseb J* 2004;18: 1291- 3.
- [34] Papadopoulos MC, Saadoun S, Davies DC, Bell BA. Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *Br J Neurosurg* 2001;15(2): 101- 8.
- [35] Verkman A.S, Binder DK, Bloch O, Auguste K, Papadopoulos MC. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1085- 93.

Archive of SID

Aquaporin 4 Expression and Protective Role of Sex Steroids on Trauma-Induced Brain Injury in Female Rats

N. Shahrokhi¹, M. Khaksari², Gh.A. Mohammadi³, R. Abassi⁴, A. Siahposht⁵, R. Mahmoodi⁶

Received: 13/09/2010

Sent for Revision: 28/12/2010

Received Revised Manuscript: 18/04/2011

Accepted: 08/05/2011

Background and Objectives: The brain damage caused by trauma is the most common cause of death. The neuroprotection effects of estrogen and progesterone have been reported in numerous studies. In the present study, the role of different doses of sex steroids has been investigated on the aquaporin 4 protein concentration changes in brain tissue of ovariectomized (OVX) rats after traumatic brain injury (TBI).

Materials and Methods: In this experimental interventional study, 140 female rats N-MRI were randomly divided into seven groups and each group further subdivided into two subgroups as follows; sham group, ovariectomized sham group, vehicle, physiologic and pharmacologic estrogen at doses 33.3 µg/kg, and 1 mg/kg respectively, physiologic and pharmacologic progesterone at doses 1.7 mg/kg and 8 mg/kg group. TBI was induced for groups 3-7 by Marmarou method. Thirty minutes after TBI, the hormones were intraperitoneally injected. Parameters such as Evans blue content, and water content and aquaporin 4 concentration were determined 5h and 24h after TBI respectively.

Results: Compared to the vehicle group, physiologic and pharmacologic doses of estrogen could significantly diminish the aquaporin 4 expression and water content ($p < 0.01$), and permeability of blood - brain barrier ($p < 0.001$). While physiologic and pharmacologic doses of progesterone had a same effect as estrogen on brain water content ($p < 0.001$), this effect was not observed on aquaporin 4 expression. The brain Evans blue content at physiologic dose of progesterone was significantly lower than vehicle group, but it was higher at pharmacologic dose ($p < 0.001$).

Conclusion: We concluded that only physiologic and pharmacologic doses of estrogen reduced the aquaporin 4 expression in OVX rats after TBI. Based on our results, estrogen may have a therapeutic effect on brain injury.

Keywords: Estrogen, Progesterone, aquaporin 4 expression, Traumatic brain injury

Funding: this research was funded by Kerman University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical Approval: the Ethical Committee of Kerman University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Shahrokhi N, Khaksari M, Mohammadi Gh.A, Abassi R, Siahposht A, Mahmoodi R. Aquaporin 4 Expression and Protective Role of Sex Steroids on Trauma-Induced Brain Injury in Female Rats. *J Rafsanjan Univ Med scie* 2012; 11(1): 21-34. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Physiology, Neuro Sciences Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2- Prof., Dept. of Physiology, Neuro Sciences Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Corresponding Author) (0341) 3220081, Fax: (0341) 3221672, E-mail: Khaksar38@yahoo.co.uk

3- Associated Prof., Dept. of Biochemistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4- General Physician, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

5- Academic Member, Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

6- MSc, Dept. of Physiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran